



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1564号
学位記番号	第1119号
氏名	加藤 晃久
授与年月日	平成 29 年 3 月 24 日
学位論文の題名	<p>Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3<math>\beta</math> and ERK1/2</p> <p>（レスベラトロールとアポシニンによる核内リン酸化 GSK3<math>\beta</math> と ERK1/2 を介した膵発癌化学予防効果）</p> <p>Oncotarget. 2015 Dec 15;6(40):42963-75</p>
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 大原 弘隆, 城 卓志

## <論文内容の要旨>

[背景・目的] 膵癌の予後は極めて不良であり有効な予防法を開発することが重要な課題となっている。近年植物由来の化合物であるフィトケミカルによる発癌予防の注目が高まっており、中でもポリフェノールの一種であるレスベラトロール(RV)は様々な癌腫において抗腫瘍効果や化学予防効果が知られ注目されているが、膵発癌予防効果については未だ報告がない。また NADPH オキシダーゼインヒビターとして知られるアポシニン(AC)も前立腺癌の発癌予防効果などが報告されているが、膵癌との関連については言及されていない。そこで動物モデルを用いて膵発癌抑制効果を明らかにすることで、これらのフィトケミカルが今後膵発癌に対する有望な化学予防剤となり得るかを検討した。またこれらのフィトケミカルは過去にアディポネクチンを誘導すると報告されている。アディポネクチンとは脂肪細胞から分泌され、インスリン感受性を増強させる作用を有しているが、近年では膵癌の発症率との関連も示唆されている。本研究ではアディポネクチンと膵発癌との関連についても同時に検討する。

[方法] N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine 誘発ハムスター膵癌モデルを用いて、RV(200mg/L)と AC(500mg/L)の飲水投与による化学予防効果を検討し、さらにアディポネクチンレベルについて解析した。またハムスター膵癌細胞株(HPD1NR, HPD2NR), ヒト膵癌細胞(AsPC1, BxPC3)およびヒト膵癌組織を用いてメカニズム解析を行った。

[結果] RV または AC 投与による体重減少などの毒性変化は見られず、臓器重量や摂餌量・飲水量も群間に差は認めなかった。また血糖や血清脂質にも有意差は見られなかったが、RV および AC の投与により膵臓における adenocarcinoma の発生頻度は有意に減少し、また dysplasia における細胞増殖活性も有意に抑制されていた。しかしアディポネクチンレベルは血清や内臓脂肪、膵組織において ELISA や RT-PCR を用いて解析したが、当初の想定と異なり明らかな群間差は認めなかった。細胞増殖抑制作用のメカニズム解明について膵癌細胞株を用いて検討すると、ハムスター・ヒト膵癌細胞の細胞増殖は RV および AC により濃度依存性に抑制され、細胞周期解析ではともに G1 arrest を伴っていることが明らかとなった。細胞増殖に関与するリン酸化シグナルについて半網羅的なウェスタン解析を行った結果、RV および AC 投与により AKT, GSK3 $\beta$ (ser9) および ERK1/2 のリン酸化タンパク発現低下と cyclin D1 の発現低下が共通に観察された。膵癌細胞において AKT および ERK1/2 のインヒビターを用いると、それぞれのリン酸化抑制に伴って cyclin D1 の発現低下が認められた。RV および AC で処理した細胞の細胞分画を行った結果、核において GSK3 $\beta$ (ser9)および ERK1/2 のリン酸化抑制と cyclin D1 の発現低下を認めることが明らかとなり、それらリン酸化タンパクの細胞内局在は蛍光免疫染色でも観察された。ハムスターの膵組織において免疫染色で核のリン酸化 GSK3 $\beta$ (ser9)を評価したところ、正常膵管に比べ dysplasia や adenocarcinoma において発現が高かった。さらに膵 dysplasia 病変における核リン酸化 GSK3 $\beta$ (ser9)発現

は RV および AC 投与群で有意に低下し、またその発現強度は Ki-67 標識率と強い相関を示した。ヒト膵癌の手術標本を同様に免疫染色で評価したところ、56 症例の中で 41 症例に核リン酸化 GSK3 $\beta$ (ser9)陽性を認め、陽性症例と陰性症例の群間では分化度やステージ分類に差は認めなかったが、核リン酸化 GSK3 $\beta$ (ser9)発現と Ki-67 標識率との相関関係は、ヒト膵癌組織においても確認された。

[結論] ハムスター膵発癌モデルを用いて RV および AC の膵発癌に対する影響を検討した結果、アディポネクチンを介さない細胞増殖抑制作用により膵発癌を抑制することが明らかとなり、RV および AC は膵癌の化学予防剤として有望である可能性が示された。また膵癌細胞株およびヒト膵癌組織を用いた解析から、そのメカニズムとして AKT-GSK3 $\beta$  および ERK1/2 経路を介する、特に核内 GSK3 $\beta$ (ser9)と ERK1/2 のリン酸化抑制に伴う細胞増殖抑制の関与が示唆され、ヒト膵癌においてもこれらの経路が細胞増殖に重要であることが見出された。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景と目的】

膵癌は早期発見が難しく予後が悪い悪性腫瘍の一つである。従って膵癌の発生機構を解明し、有効な予防法を開発することは重要な課題となっており、近年植物由来の化合物であるフィトケミカルによる発癌予防の注目が高まっている。そのようなフィトケミカルのうち、今回はポリフェノール的一种であるレスベラトロール(RV)と NADPH オキシダーゼインヒビターであるアポシニン(AC)の膵発癌抑制効果について動物モデルを用いて検討することとした。またこれらのフィトケミカルは過去にアディポネクチンを誘導すると報告されており、近年アディポネクチンは膵癌の発症率との関連も示唆されている。本研究ではアディポネクチンと膵発癌との関連についても同時に検討する。

### 【方法】

本研究ではヒトと同様に膵管に癌を誘発する N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine (BOP) 誘発ハムスター膵発癌モデルを用いて、RV と AC の飲水投与による膵発癌抑制効果を検討する。またハムスター・ヒト膵癌細胞およびヒト膵癌組織を用いてメカニズム解析を行った。

### 【結果】

RV または AC 投与による体重変化は見られず、摂餌量・飲水量も差は認めなかった。ハムスター膵癌の発生頻度および dysplasia における細胞増殖活性は RV および AC 投与により有意に抑制された。続いてアディポネクチンレベルを血清や内臓脂肪、膵組織において解析したが、明らかな群間差は認めなかった。ハムスター・ヒト膵癌細胞の細胞増殖は RV および AC により抑制され、G1 arrest を伴っていた。ウエスタンブロット解析の結果、膵癌細胞で見られる AKT、GSK3 $\beta$  および ERK1/2 のリン酸化タンパクや cyclin D1 の高発現が、RV および AC 投与により共通して低下していた。さらに細胞分画を行った結果、核において GSK3 $\beta$  (ser9)および ERK1/2 のリン酸化抑制と cyclin D1 の発現低下を認めることが明らかとなった。ハムスター膵 dysplasia 病変における核リン酸化 GSK3 $\beta$  発現は、RV および AC 投与群で有意に低下し、Ki-67 標識率と強い相関を示した。核リン酸化 GSK3 $\beta$  発現と Ki-67 標識率との相関関係は、ヒト膵癌組織においても確認された。

### 【結論】

ハムスター膵発癌モデルにおいて、RV および AC はアディポネクチンを介さない細胞増殖抑制作用により膵発癌を抑制することが明らかとなり、膵癌の化学予防剤として有望である可能性が示された。また膵癌細胞株およびヒト膵癌組織を用いた解析から、そのメカニズムとして AKT-GSK3 $\beta$  および ERK1/2 経路を介する、特に核内 GSK3 $\beta$  (ser9)と ERK1/2 のリン酸化抑制に伴う細胞増殖抑制の関与が示唆され、ヒト膵癌においてもこれらの経路が細胞増殖に重要であることが見出された

### 【審査内容】

第一副査の大原教授からは、RV や AC の投与期間やそれぞれの濃度について、また今回見出した細胞増殖抑制経路の上流シグナルの検討など 6 項目、主査の高橋からは、RV や AC の用量決定方法、ハムスター・ヒト膵癌細胞株の遺伝子変異(K-ras など)の有無、リン酸化 AMPK の変化についてどう考えるかなど 8 項目、第二副査の城教授からは臨床における膵癌化学療法の現状や診断方法の発展など 3 項目についての質問があった。これらの質問に対して学位申請者からおおむね満足のできる回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解するとともに専門領域に関する知識も十分習得しているものと判断された。本研究は RV および AC が膵癌の化学予防剤として有望である可能性を示し、そのメカニズムとして核内 GSK3 $\beta$  (ser9)と ERK1/2 のリン酸化制御に伴う細胞増殖抑制の関与を明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 高橋 智 副査 大原 弘隆、 城 卓志